

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 9 月 18 日 (18.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/076628 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/31, 15/60, C07K 14/47,
C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12Q 1/48

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/01980

(22) 国際出願日: 2003 年 2 月 24 日 (24.02.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-66955 2002 年 3 月 12 日 (12.03.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): クミアイ化学工業株式会社 (KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) [JP/JP]; 〒110-8782 東京都台東区池之端一丁目4番26号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 角 康一郎 (KAKU, Koichiro) [JP/JP]; 〒437-1207 静岡県磐田郡

福田町蛭池 2 7 6 - 1 サンハイツ蛭池 C 号 Shizuoka (JP). 渡辺 哲 (WATANABE, Satoshi) [JP/JP]; 〒418-0022 静岡県富士宮市小泉 1 8 9 0 - 3 Shizuoka (JP). 河合清 (KAWAI, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒437-0031 静岡県袋井市愛野 1 5 7 0 Shizuoka (JP). 清水 力 (SHIMIZU, Tsutomu) [JP/JP]; 〒439-0035 静岡県小笠郡菊川町平尾 1 1 4 Shizuoka (JP). 永山 孝三 (NAGAYAMA, Kozo) [JP/JP]; 〒436-0004 静岡県掛川市八坂 2 3 8 4 - 4 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CN, JP, KR, US.

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SCYTALONE DEHYDROGENASE GENE SHOWING TOLERANCE TO AGRICULTURAL PESTICIDE

(54) 発明の名称: 農業用殺菌剤に対して耐性を示すシタロン脱水酵素遺伝子

(57) Abstract: It is intended to provide a gene which is widely usable in studies on tolerant rice blast fungus *Pyricularia oryzae*, etc. A gene encoding the following protein (a) or (b): (a) A protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2. (b) A protein comprising an amino acid sequence derived from the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 by deletion, substitution or addition of one or more amino acids and showing a scytalone dehydrogenase activity in the presence of a scytalone dehydrogenase inhibitor.

(57) 要約: 耐性いもち病菌に関する研究等に広範囲に使用することが出来る遺伝子を提供する。以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子。(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質。(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列における 1 以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、シタロン脱水酵素阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すタンパク質。

明 細 書

農業用殺菌剤に対して耐性を示すシタロン脱水酵素遺伝子

技術分野

本発明は、イネに発症するいもち病の原因菌として知られているいもち病菌におけるシタロン脱水酵素をコードする遺伝子に関する。

背景技術

いもち病菌 (*Pyricularia oryzae*, *Magnaporthe grisea*) によって引き起こされるイネいもち病はイネを栽培しているほとんどの国で認められているが、特に日本をはじめとする高温多湿な気候の地域では、農業上重大な病気の一つに挙げられる。従って高収量の稲作を達成するためには、イネいもち病の防除は必要不可欠である。近年、治療効果を持つ薬剤に代わり、予防効果のある箱処理型の薬剤の使用によって、いもち病菌防除における農家の労力が省力化される傾向にある。このような剤としてカルプロパミド (carpropamid; ((1RS, 3SR)-2, 2-dichloro-N-((R)-1-(4-chlorophenyl)ethyl)-1-ethyl-3-methylcyclopropanecarboxamide)) に代表されるシタロン脱水酵素 (以下、SCDH) 阻害剤を挙げることができる (Kurahashi et al., J. Pestic. Sci, 23, 22-28, 1998; Motoyama et al., J. Pestic. Sci, 23, 58-61, 1998)。SCDH はメラニン生合成経路におけるシタロンから 1, 3, 8-トリヒドロキシナフタレン (以下 1, 3, 8-THN) への脱水反応を触媒する酵素である。

いもち病菌がイネ葉表面のクチクラ層を破り侵入する際、感染特異的器官である付着器中のグリセロール濃度を 80 気圧にも上昇させるが、このグリセロールを付着器中に閉じこめるために細胞壁のメラニン層が必要不可欠となる (鎌倉ら, 化学と生物, 39, 340-347, 2001)。メラニンの生合成が阻害されると、付着器が形成できなくなる。従って SCDH 阻害剤は直接的に殺菌力を示す薬剤ではなく、病原性を抑えることで防除活性を現わす非殺菌性の薬剤である。

糸状菌の SCDH 遺伝子については、最初に *Pyricularia oryzae* で解明されたが、

その塩基配列は公開されずに SCDH タンパク質の 3 次元構造だけが報告された (Landquist et al., Structure, 2, 937-944, 1994)。その後、Colletorichum lagenarium (ウリ類炭素病菌) (Kubo et al., Appl. Environment. Microbiol, 62, 4340-4344, 1996; アクセッション番号 D86079) で報告され、続いて、Aspergillus fumigatus (Tsai et al., Mol. Microbiol, 26, 175-183, 1997; アクセッション番号 U95042)、Pyricularia oryzae (Motoyama et al., Biosci. Biotech. Biochem, 62, 564-566, 1998; アクセッション番号 AB004741)そして Ophiostoma floccosum (Wang et al., アクセッション番号 AF316575) で報告されている。また、カルプロパミドが結合した SCDH タンパク質の 3 次元構造についても報告されている (Nakasako et al., Biochemistry, 37, 9931-9939, 1998; Wawrzak et al., Proteins: Struct. Func. Genet, 35, 425-439, 1999)。

発明の開示

ところで、近年、カルプロパミド等の SCDH 阻害剤に対する感受性が低下したいもち病菌 (以下、「耐性いもち病菌」と称する。)が見出された。上述したように、カルプロパミド等の SCDH 阻害剤は稲作において非常に重要な薬剤であるため、耐性いもち病菌における感受性決定要因を究明し、且つ、耐性いもち病菌の防除対策を立てることは、安定した稲作を継続する上で非常に重要である。

しかしながら、耐性いもち病菌における感受性決定要因の解明や、耐性いもち病菌の生息地域の特定等、耐性いもち病菌に関する研究はほとんどなされていないのが現状である。

上述した目的を達成するために、本発明者が鋭意検討した結果、耐性いもち病菌における感受性決定要因を解明することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下を包含する。

(1) 以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列における 1 以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、シタロン脱水酵素阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すタンパク質。

(2) 上記シタロン脱水酵素阻害剤は、メラニン生合成経路におけるシタロンから 1,3,8-トリヒドロキシナフタレンへの脱水反応を阻害することを特徴とする(1)記載の遺伝子。

(3) 上記シタロン脱水酵素阻害剤は、カルプロパミドであることを特徴とする(1)記載の遺伝子。

(4) (1) 記載の遺伝子によりコードされるシタロン脱水酵素。

(5) (1) 記載の遺伝子を含む組換えベクター。

(6) (5) 記載の組換えベクターを形質転換してなる形質転換体。

(7) 以下の工程を有するいもち病菌のシタロン脱水酵素阻害剤に対する感受性評価方法。

(a) 評価対象のいもち病菌におけるシタロン脱水酵素のアミノ酸配列における、配列番号 4 に示すアミノ酸配列の 75 番目のバリンに相当するアミノ酸を同定する工程。

(b) 上記 (a) 工程の結果に基づいて、評価対象のいもち病菌のシタロン脱水酵素阻害剤に対する感受性を評価する工程。

(8) 上記 (b) 工程では、上記 (a) 工程で同定した上記アミノ酸がメチオニンである場合に、野生型のいもち病菌と比較して、評価対象のいもち病菌がシタロン脱水酵素阻害剤に対して低い感受性を示すと評価することを特徴とする(7) 記載の感受性評価方法。

(9) (4) 記載のシタロン脱水酵素を含む、阻害剤スクリーニングキット。

(10) 配列番号 4 で示すアミノ酸配列における 75 番目のバリンに相当するアミノ酸をコードする塩基配列を挟むように設計した一対のプライマーを備える、シタロン脱水酵素阻害剤抵抗性いもち病菌評価キット。

(11) 配列番号 4 で示すアミノ酸配列における 75 番目のバリンに相当するアミノ酸をコードする塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを備える、シタロン脱水酵素阻害剤抵抗性いもち病菌評価キット。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に係る遺伝子は、シタロン脱水酵素阻害剤（以下、SCDH 阻害剤）の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すシタロン脱水酵素（以下、「変異 SCDH 酵素」と

呼ぶ) をコードするものである。なお、以下の説明において、SCDH 阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性が低下するシタロン脱水酵素を、単に SCDH 酵素或いは野生型 SCDH 酵素と呼ぶ。

SCDH 阻害剤としては、例えば、カルプロパミド (carpropamid; (2, 2-dichloro-N-(1-(4-chlorophenyl)ethyl)-1-ethyl-3-methylcyclopropanecarboxamide)、フェノキサニル (1-(2, 4-dichlorophenyl)oxy-N-(1-cyano-1, 2-dimethyl)propylethanecarboxamide)、ジクロシメット (N-[1-(2, 4-dichlorophenyl)ethyl]-1-cyano-2, 2-dimethylpropanecarboxamide) 等が挙げられる。SCDH 阻害剤は、通常、いもち病菌のイネに対する感染阻害剤として使用され、SCDH 酵素の活性を阻害する。具体的に、SCDH 酵素は、図 1 に示すメラニン生合成経路において、シタロンから 1, 3, 8-トリヒドロキシナフタレン (以下、「1, 3, 8-THN」と呼ぶ) への脱水反応、及び、バーメロンから 1, 8-ジヒドロキシナフタレンへの脱水反応を触媒する。

SCDH 阻害剤は、この SCDH 酵素の活性を阻害することによって、いもち病菌における付着器の形成を阻害し、イネに対する病原性を抑制することができる。すなわち、SCDH 阻害剤は、いもち病菌の感染力を低下させることによって、いもち病の発生を防止する。これに対して、変異 SCDH 酵素は、SCDH 阻害剤の存在下であっても、上述した酵素活性を示すことによって、いもち病菌に対して SCDH 阻害剤に対する抵抗性を付与している。したがって、変異 SCDH 酵素を発現するいもち病菌 (以下、「耐性いもち病菌」又は「抵抗性株」と呼ぶ) は、SCDH 阻害剤の存在下であってもメラニン生合成が阻害されず、付着器を形成することができ、イネ葉表面のクチクラ層を破り侵入することができる。すなわち、耐性いもち病菌は、SCDH 阻害剤の存在下であっても高い感染力を示す。

変異 SCDH 酵素としては、配列番号 2 のアミノ酸配列からなるものが挙げられる。また、変異 SCDH 酵素は、配列番号 2 のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、シタロン脱水酵素阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すものであってもよい。ここで、1 以上とは、例えば、1 ~ 30 個、好ましくは、1 ~ 20 個、より好ましくは、1 ~ 10 個を意味する。

野生型 SCDH 酵素又は変異 SCDH 酵素における酵素活性は、シタロンから 1, 3, 8-THN への脱水反応、或いは、バーメロンから 1, 8-ジヒドロキシナフタレンへの脱

水反応を測定することによって評価できる。すなわち、野生型 SCDH 酵素又は変異 SCDH 酵素と基質（シタロン又はバーメロン）とを含む反応溶液で酵素反応を進行させ、基質の減少量及び/又は反応産物（1, 3, 8-THN 又は 1, 8-ジヒドロキシナフタレン）の増加量を測定することによって、野生型 SCDH 酵素又は変異 SCDH 酵素の酵素活性を評価できる。

具体的には、シタロンから 1, 3, 8-THN への酵素反応を分光的に測定することができる。例えば、シタロンの減少量を測定するには、Motoyama et al., J. Pestic. Sci, 23, 58-61, 1998 に準じて行うことができる。

一方、1, 3, 8-THN の増加量は、基質であるシタロンと生成物である 1, 3, 8-THN のそれぞれの UV 吸収スペクトル（図 2 に示す）から、200～300nm では 1, 3, 8-THN の吸収はシタロンの吸収と被さっているが、340～360nm ではシタロンの吸収がほとんど無視できるため、340～360nm での UV 吸収スペクトルで測定することができる。なお、340～360nm での UV 吸収スペクトルで測定する方法では、酵素反応を 100 秒間測定することによるレートアッセイにより行うことにより、SCDH 阻害剤に対する野生型 SCDH 酵素又は変異 SCDH 酵素の感受性を測定することができる。

この方法によれば、所定の濃度で SCDH 阻害剤（例えばカルプロパミド）を添加した反応溶液において酵素反応を進行させ、340～360nm での UV 吸収スペクトルを測定することによって、反応産物である 1, 3, 8-THN の合成量を測定できる。そして、測定した 1, 3, 8-THN の合成量を、SCDH 阻害剤の非存在下における 1, 3, 8-THN の合成量で除算することによって、SCDH 阻害剤の当該濃度における阻害率とする。そして、野生型 SCDH 酵素及び変異 SCDH 酵素について、SCDH 阻害剤の濃度を変化させて阻害率を測定し、各酵素における I50 値を算出する。野生型 SCDH 酵素の I50 値と変異 SCDH 酵素の I50 値とから、R/S 比を算出することによって、変異 SCDH 酵素における SCDH 阻害剤に対する感受性を評価することができる。例えば、算出した R/S 比が 2 以上である場合、変異 SCDH 酵素は野生型 SCDH 阻害剤と比較して、SCDH 阻害剤に対する感受性が低いと定義できる。

なお、変異 SCDH 酵素の酵素活性は、上述した方法に限定されず、如何なる方法を適用して測定しても良い。変異 SCDH 酵素の酵素活性方法としては、例えば、酵素反応生成物である 1, 3, 8-トリヒドロキシナフタレンの HPLC による分析定量

等を用いた方法を例示することができる。

変異 SCDH 酵素をコードする遺伝子（以下、「変異 SCDH 遺伝子」と呼ぶ）は、上述した変異 SCDH 酵素をコードする塩基配列を含むものであれば、イントロンを含むゲノム DNA から得たものでも良いし、イントロンを含まない cDNA から得られたものであっても良い。

変異 SCDH 遺伝子は、例えば、いもち病菌の SCDH 酵素の cDNA 配列から設計したプライマーと、SCDH 阻害剤に抵抗性を示すいもち病菌（以下、「耐性いもち病菌」と呼ぶ）のゲノム DNA とを用いた PCR によって得ることができる。また、変異 SCDH 遺伝子は、上記プライマーと、耐性いもち病菌から抽出した mRNA とを用いた RT-PCR によって得ることもできる。なお、いもち病菌の SCDH 酵素の cDNA 配列は公知であり、Motoyama らの Biosci. Biotech. Biochem, 62, 564-566, 1988 (DNA データバンク、アクセッション番号 AB004741) に記載されている。

このような方法によって得られた変異 SCDH 遺伝子は、例えば、配列番号 1 に示すような塩基配列を含んでいる。変異 SCDH 遺伝子及び野生型 SCDH 酵素をコードする遺伝子（以下、SCDH 遺伝子と呼ぶ）の塩基配列（cDNA）を比較した結果を図 3 に示す。また、ゲノム DNA における変異 SCDH 遺伝子及び SCDH 遺伝子の塩基配列を比較した結果を図 4 に示す。図 3 及び図 4 に示すように、変異 SCDH 遺伝子においては、SCDH 遺伝子における 223 番目の G（グアノシン）が A（アデノシン）にホモに変異している。この変異は、野生型 SCDH 酵素における 75 番目のバリン（Val）がメチオニン（Met）へ変異することを意味している。

また、変異 SCDH 遺伝子及び SCDH 遺伝子の塩基配列を比較した結果、変異 SCDH 遺伝子においては、450 番目の T（チミジン）が C（シチジン）に変異していた。但し、この変異はアミノ酸変異を伴っていない。

また、図 3 及び図 4 の比較から、変異 SCDH 遺伝子は、変異 SCDH 酵素のアミノ酸配列における 42 番目及び 43 番目の間と 141 番目及び 142 番目の間とに、それぞれ 81 塩基と約 89 塩基のイントロンを有している。なお、後者のイントロン（変異 SCDH 酵素のアミノ酸配列における 141 番目及び 142 番目の間）はポリ A 鎖が連なっていたため、PCR を行った際、長さの異なるものが生成してきてしまい明確な長さを決定できなかったため、約 89 塩基となっている。

変異 SCDH 遺伝子としては、配列番号 1 の塩基配列には限定されず、配列番号 2

のアミノ酸配列からなるタンパク質、或いは、配列番号2のアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、シタロン脱水酵素阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すタンパク質をコードする塩基配列であればいかなるものであってもよい。このような塩基配列としては、例えば、配列番号1の塩基配列において、アミノ酸変異を伴わない塩基置換が生じた塩基配列を挙げることができる。

また、変異 SCDH 遺伝子としては、配列番号1の塩基配列に相補的な塩基配列に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列であって、シタロン脱水酵素阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すタンパク質をコードする塩基配列からなるものであってもよい。ここで、ストリンジェントな条件とは、例えばナトリウム濃度が、10mM～300mM、好ましくは20～100mMであり、温度が25℃～70℃、好ましくは42℃～55℃での条件をいう。

変異 SCDH 遺伝子は、例えば、SCDH 阻害剤の存在下でもイネに対して感染するいもち病菌から得られたゲノム DNA を鋳型とし、所定の配列を有する一対のプライマーを用いた PCR によって得ることができる。ゲノム DNA の調製法としては、何ら限定されないが、例えば、CTBA(cetyltrimethylammonium bromide)を抽出液として用いる方法、SDS/フェノール又はフェノール/クロロホルム抽出による方法、また市販のキット、例えば Qiagen 社の DNeasy Plant System、Amersham Biosciences 社の Nucleon PhytoPure キット等を挙げることができる。

さらに、変異 SCDH 遺伝子は、SCDH 阻害剤の存在下でもイネに対して感染するいもち病菌から全量 mRNA を抽出し、全量 mRNA 及び所定の配列を有する一対のプライマーを用いた RT-PCR によっても得ることができる。いもち病菌からの全量 mRNA の抽出方法としては、何ら限定されないが、例えば、グアニジウム法、SDS-フェノール法、フェノール/クロロホルム抽出、若しくは市販の例えば Qiagen 社の RNeasy Total RNA System、Amersham Biosciences 社の Quick Prep Micro mRNA Purification Kit、Quick Prep Total RNA Extraction Kit 等を挙げることができる。

上述した PCR 及び RT-PCR に使用する一対のプライマーは、例えば遺伝子バンクに登録されているいもち病菌のゲノム DNA の塩基配列に基づいて、SCDH 遺伝子を挟み込むように設計することができる。一対のプライマーは、いもち病菌のゲノ

ム DNA の塩基配列に基づいて更に機能的な配列を付加して設計することもできる。機能的な配列とは、ベクターに連結するための制限酵素の認識配列や、フレームを合わせるための挿入配列等を挙げることができる。

例えば、一对のプライマーとしては、以下のものを挙げるがこれに限定されるものではない。

プライマー1(配列番号5): 5'-GCAGTGATACCCACACCAAAG-3'

プライマー2(配列番号6): 5'-TTATTTGTCGGCAAAGGTCTCC-3'

プライマー3(配列番号7): 5'-AGTTCGAACTGGAATTCCAACCGGCACGCATGATGCATGCATTTA-3'

プライマー4(配列番号8): 5'-ATGGGTTCGCAAGTTCAAAAG-3'

プライマー5(配列番号9): 5'-GTGGCCCTTCATGGTGACCTCCT-3'

プライマー6(配列番号10): 5'-ACAAGCTCTGGGAGGCAATG-3'

プライマー7(配列番号11): 5'-ATCGTCGACGTGAATTCGTCTTGTAAAAGCCGCCAAC-3'

なお、プライマー1、4、6 及び7はセンスプライマーであり、プライマー2、3 及び5はアンチセンスプライマーである。したがって、一对のプライマーとしては、一方をセンスプライマーから選択し、他方をアンチセンスプライマーから選択する。

プライマー2は、公知文献(Motoyama et al., Biosci. Biotech. Biochem, 62, 564-566, 1988)に開示された塩基配列に基づいて合成したため、アンダーラインで示した塩基が「G」となっている。しかしながら、DNA データバンクのアクセッション番号 AB004741 に記載された相当する塩基は「C」である。当該塩基は「C」が正しいが、当該塩基が「G」であっても、PCR 及び RT-PCR の結果には影響しない。プライマー3 及びプライマー7 中のアンダーラインで示した文字は Eco RI 認識配列を示している。この Eco RI 認識配列は、タンパク発現ベクター等に組み込む際利用することができる。プライマー3 及びプライマー7 において、Eco RI 認識配列より 5' 側の塩基配列は、Eco RI が Eco RI 認識配列を認識するように余裕を持たせるために付加した塩基配列である。プライマー7 において、Eco RI 認識配列より 3' 側の2個の塩基配列(すなわち、プライマー7 における18番目及び19番目の「GT」)は、タンパク質発現ベクター(pGEX-2T)に組み込む際のフレーム合わせ用の塩基配列である。

例えば、プライマー7とプライマー3を用い全量RNAを鋳型としてRT-PCRを行い、得られたPCR生成物をEco RI処理後、予めEco RI消化とアルカリフォスファターゼでのBAP処理を行ったpGEX-2T (Amersham Biosciences社製)に組み込んでなるプラスミドを調製することができる。このプラスミドはRice Blast Mutant SCDH cDNA (FERM BP-7948)として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に、平成2002年3月8日付でブタペスト条約に基づき国際寄託されている。

このプラスミド(Rice Blast Mutant SCDH cDNA)は、大腸菌等の宿主内でグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(以下、GSTと呼ぶ)との融合タンパク質としてSCDH酵素を発現することができる。なお、無細胞系のタンパク質発現システムに適用できるように、変異SCDH遺伝子を有するプラスミドを構築してもよい。

さらにまた、変異SCDH遺伝子は、SCDH阻害剤の存在下でもイネに対して感染するいもち病菌由来のcDNAライブラリー及び所定のプローブを用いて得ることができる。

さらにまた、変異SCDH遺伝子は、野生型SCDH遺伝子に対して突然変異を誘発して得ることもできる。例えば、野生型SCDH遺伝子における75番目のバリン(Val)をコードするコドン、メチオニン(Met)をコードするコドンに変異させるように設計したプライマーを用いた、いわゆる部位特異的突然変異法によって、変異SCDH遺伝子を得ることができる。部位特異的突然変異法を用いて変異SCDH遺伝子を得るには、市販のキットを使用することができる。市販のキットとしては、例えば、宝酒造社のTaKaRa LA PCR in vitro Mutagenesis kit等を挙げることができる。

ところで、上述した変異SCDH遺伝子は、後述する実施例で示すように、耐性いもち病菌の感染力を低下させるような新規なSCDH阻害剤をスクリーニングする際に有効である。特に、上述した変異SCDH遺伝子を発現可能な状態で組み込んだ発現ベクターを用いて、当該変異SCDH酵素を発現させ、新規SCDH阻害剤としての候補物質が存在する条件下で、発現した変異SCDH酵素の酵素活性を測定する。当該候補物質が存在する場合に、変異SCDH酵素の酵素活性が低下しているか否かを判定することで新規なSCDH阻害剤をスクリーニングすることができる。

特に、従前の判定方法では、候補物質の存在下における、いもち病菌の付着器

形成阻害を、イネそのものを使用したいいわゆるポット試験やシャーレ寒天上に貼ったセロハンを付着器が破るのを観察する試験で評価しており、迅速な SCDH 阻害剤のスクリーニングを行うことが困難であった。これに対して、上述した方法によれば、簡便な方法によって SCDH 酵素の酵素活性を測定できるため、新規な SCDH 阻害剤の迅速なスクリーニングを行える。

また、上述した変異 SCDH 遺伝子の塩基配列解析から、SCDH 酵素における 75 番目のバリン (Val) がメチオニン (Met) へ変異した変異 SCDH 酵素において、SCDH 阻害剤の存在下で酵素活性を示すため、SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を解析することによって、解析対象の SCDH 遺伝子が SCDH 阻害剤に対して耐性を有するか否かを調べられる。

すなわち、所定の地域等で採取されたいもち病菌（解析対象のいもち病菌）が SCDH 阻害剤に対する感受性があるか否かを検討する際、当該いもち病菌における SCDH 遺伝子（解析対象の SCDH 遺伝子）の、SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸を同定することによって、当該いもち病菌の SCDH 阻害剤に対する感受性を評価できる。

解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を決定する際には、如何なる方法を用いても良く、特に限定されない。SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を決定する際には、例えば、少なくとも SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を含む塩基配列を挟み込むように設計された一対のプライマーと、鋳型 DNA (cDNA 又はゲノム DNA) を用いて、鋳型 DNA の所定の領域について塩基配列を決定する。決定した塩基配列に基づいて、解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸を同定することができる。

解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を決定する際には、特に、解析対象のいもち病菌を固体培養した後、糸状菌糸体を取り、当該菌糸体に対してマイクロウェーブを照射することで、鋳型となるゲノム DNA を得ることが好ましい。マイクロウェーブを照射するには、例えば、電子レンジ等を使用することができる。この方法により鋳型となるゲノム DNA を得た場合には、解析対象のいもち病菌を液体培養した後に集菌し、定法に従ってゲノム DNA を抽出する方法と比較して、非常に短時間でゲノム DNA を得ることができる。

さらに、解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を決定する際には、特に、一方のプライマーを、75 番目のアミノ酸をコードする塩基配列の近傍、例えば 40 塩基上流にハイブリダイズするように設計することが好ましい。これにより、非常に短時間に解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を決定することができる。

さらにまた、解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を決定する際には、配列番号 4 で示すアミノ酸配列における 75 番目のバリンに相当するアミノ酸をコードする塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを使用することができる。例えば、解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸がメチオニンである場合に、当該 SCDH 酵素をコードする遺伝子にこのオリゴヌクレオチドがハイブリダイズするように、オリゴヌクレオチドを設計する。そして、このオリゴヌクレオチドをプローブとして用いるコロニーハイブリダイゼーションやサザンハイブリダイゼーション等の方法により、解析対象のいもち病菌における SCDH 酵素の 75 番目のアミノ酸を同定することができる。この方法によっても、解析対象のいもち病菌における SCDH 阻害剤に対する感受性を評価することができる。

さらにまた、解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸を解析する際には、一本鎖 DNA 高次構造多型（以下、SSCP と呼ぶ）を利用することもできる。すなわち、予め、野生型の SCDH 遺伝子と耐性 SCDH 遺伝子とにおける、一本鎖高次構造の相違に起因する泳動パターンの違いを検出しておき、解析対象の SCDH 遺伝子の一本鎖高次構造に基づく泳動パターンと比較する。これによって、解析対象の SCDH 遺伝子が、SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を同定することができる。解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸を解析する際に SSCP を利用することによって、解析対象のいもち病菌の SCDH 阻害剤に対する感受性を極めて短時間に判別することができる。

さらにまた、解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸を解析する際には、改変した PCR-制限断片長多型(RFLP)解析法（以下、「改変 PCR-RFLP 法」と呼ぶ）を適用することもできる。すなわち、改変 PCR-RFLP 解析法によって、解析対象いもち病菌の SCDH 酵素における、75 番目のバリン(Val)からメチオニン(Met)への変異（以下、Val75Met 変異と呼ぶ）を簡易的に検定することもできる。

改変 PCR-RFLP 解析法に際して、PCR に用いる一方のプライマーとしては、223 番目の塩基（SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードするコドンに含まれる塩基）を含まず、且つ、223 番目塩基の種類によっては、3' 末端側に制限酵素認識配列を有するように設計する。このとき、当該一方のプライマーは、前記制限酵素認識配列を含むように、鋳型となるゲノム DNA 或いは cDNA の塩基配列と一部ミスマッチする塩基を含んでいても良い。制限酵素認識配列としては、特に限定されないが、Xba I が認識する配列を使用することができる。

改変 PCR-RFLP 解析法では、先ず、上述したように設計した一対のプライマーと、鋳型となるゲノム DNA 或いは cDNA を用いて PCR を行う。PCR に際しては、温度や時間等の各種条件を適宜設定することによって、鋳型とミスマッチする塩基が含まれているプライマーを用いても、所望の鋳型の領域を増幅することができる。PCR によって得られた産物は、223 番目の塩基によっては上記一方のプライマーとともに制限酵素認識配列を含んでおり、また、223 番目の塩基によっては制限酵素認識配列を含まないものとなる。

次に、PCR によって得られた産物を、上記一方のプライマーに含まれる制限酵素認識配列を認識する制限酵素で処理する。この制限酵素処理によれば、223 番目の塩基の違いによって得られる断片長が異なることとなる。次に、制限酵素処理によって得られた断片長を、例えば、電気泳動等の方法によって検出することによって、223 番目の塩基を同定することができ、解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸を解析することができる。

さらにまた、解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸を解析する際には、一般的に知られている一塩基多型タイピング方法を適用することもできる。一塩基多型タイピング方法としては、例えば、Applied Biosystems 社の SNaPshot Multiplex Kit（シングルプライマー伸長反応）、Qiagen 社の Masscode system（質量分析システム）、Sequenom 社の MassARRAY システム、宝酒造社の UCAN 法、Cleavase を用いたインベーター法、マイクロアレイを使用した方法等が挙げられる。

図面の簡単な説明

図 1 は、いもち病菌におけるメラニン生合成経路を説明する図である。

図 2 は、シタロンと 1, 3, 8-THN との UV 吸収スペクトルを示す特性図である。

図 3 は、遺伝子バンクに登録されているいもち病菌の SCDH 遺伝子の塩基配列、標準菌株の SCDH 遺伝子の塩基配列 (cDNA) 及び抵抗性株の SCDH 遺伝子の塩基配列 (cDNA) を比較して示す図である。

図 4 は、遺伝子バンクに登録されているいもち病菌の SCDH 遺伝子の塩基配列、標準菌株の SCDH 遺伝子の塩基配列 (ゲノム DNA) 及び抵抗性株の SCDH 遺伝子の塩基配列 (ゲノム DNA) を比較して示す図である。

図 5 は、標準菌株及び抵抗性株 (A 及び B) それぞれから抽出した粗酵素液について、カルプロパミド濃度と SCDH 酵素活性の阻害率との関係を示す特性図である。図中、○は標準菌株由来の粗酵素液を示し、△は抵抗性株 A 由来の粗酵素液を示し、□は抵抗性株 B 由来の粗酵素液を示す。

図 6 は、実施例 4 で行った一本鎖 DNA 高次構造多型 (SSCP) 解析法の結果を示す電気泳動写真であり、A (左側) は GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit を用いた精製を行わずに電気泳動を行った場合の結果である。B (右側) は GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit を用いて精製を行った後に電気泳動を行った場合の結果である。

図 7 は、プラスミド Rice Blast wild SCDH cDNA 及び Rice Blast Mutant SCDH cDNA の作製方法を概略的に示す図である。

図 8 は、標準菌株の cDNA を大腸菌中で発現させた GST 融合 SCDH 酵素、抵抗性株の cDNA を大腸菌中で発現させた GST 融合 SCDH 酵素、標準菌株の粗酵素液及び抵抗性株の粗酵素液とについて、カルプロパミド濃度と SCDH 酵素活性の阻害率との関係を示す特性図である。図中、○は標準菌株由来の粗酵素液を示し、△は標準菌株 cDNA から発現した GST 融合 SCDH 酵素を示し、●は抵抗性株由来の粗酵素液を示し、▲は抵抗性株 cDNA から発現した GST 融合 SCDH 酵素を示している。

図 9 は、標準菌株の cDNA を大腸菌中で発現させた GST 融合 SCDH 酵素及び抵抗性株の cDNA を大腸菌中で発現させた GST 融合 SCDH 酵素について、フェノキサニル及びジクロシメットの濃度と阻害率との関係を示す特性図である。図中、○は標準菌株 cDNA から発現した GST 融合 SCDH 酵素に対するフェノキサニルによる阻害を示し、△は抵抗性株 cDNA から発現した GST 融合 SCDH 酵素に対するフェノキ

サニルによる阻害を示し、●は標準菌株 cDNA から発現した GST 融合 SCDH 酵素に対するジクロシメットによる阻害を示し、△は抵抗性株 cDNA から発現した GST 融合 SCDH 酵素に対するジクロシメットによる阻害を示している。

図 10 は、実施例 6 で行った PCR-RFLP 法を応用して SCDH 酵素における、Val75Met 変異を解析した結果を示す電気泳動写真 (3%アガロースゲル) である。

発明を実施するための最良の形態

〔実施例〕

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明する。しかしながら、本発明の技術的範囲は、これら実施例に限定されるものではない。

実施例 1

本例では、まず、SCDH 酵素を抽出する際に用いる糸状菌糸体を調製した。標準 (野性) 菌株のイネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) 及びカルプロパミド耐性を示すイネいもち病菌 (抵抗性株 (A 及び B)) の孢子溶液 ($10^5/\text{ml}$) を、それぞれ yeast 抽出物 (5g)、グルコース (20g)、 KH_2PO_4 (0.5g)、 Na_2HPO_4 (0.5g) 及び CaCl_2 (0.5mg) を含む YGPCa 液体培養液 (pH6.5) 200ml に接種し、27°C で 4~5 日培養した。

培養後、培養液を遠心分離にかけて糸状菌糸を収集後、蒸留水で洗浄し、菌糸重量の 5 倍量の冷アセトンを加え、Waring blender でホモジナイズした。ホモジネートを遠心し ($15,000 \times g$, 20 分)、沈降物を 4°C で乾燥してアセトンパウダーを得た。このアセトンパウダーを -85°C で保存した。

得られたアセトンパウダーを用いて、SCDH 酵素を含む粗酵素液を調製し、当該 SCDH 酵素の酵素活性を測定した。SCDH 酵素を含む粗酵素液を調製する際には、アセトンパウダーを 20ml の 1/15M リン酸カリウムバッファー (pH6.8) に懸濁し、氷冷下、30 分攪拌した後、 $15,000 \times g$ で 15 分間遠心分離した。遠心分離により得られた上澄みを粗酵素液とした。

次に、粗酵素液を用いて SCDH 酵素の酵素活性を測定する際には、まず、1mM EDTA 含有 100mM リン酸バッファー (pH6.8) 1,300 μl 、20mM シタロン (エタノール溶液) 30 μl 、適当な濃度のカルプロパミドのエタノール溶液 30 μl および超純水 1,440

μl を混合し、 27°C で 2 分間ブレインキュベートした。次に、粗酵素液 $200\mu\text{l}$ を添加して酵素反応を開始した。酵素反応によりシタロンから生成された 1, 3, 8-THN 量を UV350nm での吸光度上昇として、100 秒間モニタリングすることにより粗酵素液に含まれる SCDH 酵素に起因する酵素活性を測定した。なお、基質のシタロンはカルプロパミド存在下で標準（野性）菌を液体培養し、得られた菌糸体から常法（Kurahashi *et al.*, J. Pestic. Sci, 23, 22-28, 1998）により調製した。

結果を図 5 に示す。この結果を用いて 50% 阻害濃度 (I_{50} 値) をプロビット解析により算出した。その結果、標準（野性）菌から抽出された粗酵素液ではカルプロパミドに対する I_{50} 値が 7.45nM であったのに対し、抵抗性菌株 A 及び B ではそれぞれ 163nM 及び 157nM であった。これらの値から、R/S 比はおおよそ 21.5 であった。このことは、抵抗性菌株 A 及び B におけるカルプロパミド耐性の要因が、カルプロパミドのターゲットであるシタロン脱水酵素の感受性が低下したことによることを示唆した。

実施例 2

本例では、まず、いもち病菌からゲノム DNA 及び mRNA を抽出するため、以下のように糸状菌糸体を調製した。まず、標準（野性）菌及びカルプロパミド耐性を示すいもち病菌（抵抗性株（A 及び B））をオートミール培地上でそれぞれ培養した。培養後、菌糸体部分を 20ml の potato-dextrose (PD) 液体培地に接種し、 28°C で 3 日間、前培養した。前培養によって生長した糸状菌糸が団子状となるため、これを滅菌した Waring blender でホモジナイズし、その内 1ml ずつを 20ml の PD 液体培地中で更に 3~5 日間培養した。菌糸体を減圧濾過により濾別後、蒸留水で洗浄した。これらの菌子体を液体窒素下、乳鉢ですりつぶし、微粉末とし、 -85°C で保存した。これにより、標準（野性）菌由来の微粉末、抵抗性株 A 由来の微粉末及び抵抗性株 B 由来の微粉末が得られた。

抵抗性株 A 由来の微粉末を用いて全量 RNA を抽出する際には、Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen 社製) を用い、添付のプロトコルに従った。得られた微粉末を用いてゲノム DNA を抽出する際には、Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen 社製) を用い、添

付のプロトコルに従った。RNA 濃度は分光光度計で OD₂₆₀ での吸光度を測定することにより定量した。DNA 濃度は 1% アガロースゲル上での明度の様子か、Hoe 33258 (ヘキスト社製) を用いた蛍光スペクトルの測定によった。

次に、得られた全量 RNA を用いて抵抗性株の変異 SCDH 遺伝子を含む cDNA を調製した。変異 SCDH 遺伝子を含む cDNA を調製する際には、先ず、得られた RNA (2 μ g) を、最終容量が 50 μ l となるように、2 μ l の oligo(dT)₂₀ (10pmol/ μ l)、各々 2 μ l のプライマー 1 (5'-GCAGTGATACCCACACCAAAG-3', 25pmol/ μ l) 及びプライマー 2 (5'-TTATTTGTCGGCAAAGGTCTCC-3', 25pmol/ μ l) 並びに RT-PCR bead (Amersham Biosciences 社製) と混合し反応溶液を調製した。反応は以下の条件に従って行った。cDNA の合成として 42°C で 30 分、続いて 95°C で 30 分反応した。続いて、合成した cDNA を鋳型とする PCR 反応として 95°C で 30 秒、55°C で 1 分及び 72°C で 1 分からなるステップを 35 サイクル繰り返し、最終サイクルの後、72°C で 7 分間反応を完結させた。反応後の反応溶液を、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences 社製) を用いて精製することによって RT-PCR 生成物を得た。なお、標準菌株の SCDH 遺伝子を含む cDNA 及び抵抗性株 B の SCDH 遺伝子を含む cDNA も上述した方法と同様にして、得ることができた。

一方、得られたゲノム DNA を用いて抵抗性株 A の変異 SCDH 遺伝子を含む DNA を調製した。変異 SCDH 遺伝子を含む DNA を調製する際には、先ず、得られたゲノム DNA 4 μ l を、最終容量が 25 μ l となるように、各々 1 μ l のプライマー 1 (5'-GCAGTGATACCCACACCAAAG-3', 25pmol/ μ l) 及びプライマー 3 (5'-AGTTCGAACTGGAATTCAACCGGCACGCATGATGCATGCATTTA-3', 25pmol/ μ l) 及び PCR bead (Amersham Biosciences 社製) と混合して反応溶液を調製した。反応は以下の条件に従って行った。ゲノム DNA を鋳型とする PCR 反応として、95°C で 30 秒、55°C で 1 分及び 72°C で 2 分からなるステップを 40 サイクル繰り返し、最終サイクルの後、72°C で 7 分間反応を完結させた。反応後の反応溶液を GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences 社製) を用いて精製することによって PCR 生成物を得た。なお、標準菌株の SCDH 遺伝子を含む DNA 及び抵抗性株 B の SCDH 遺伝子を含む DNA も上述した方法と同様にして、得ることができた。

次に、得られた RT-PCR 産物及び PCR 産物を用いて、変異 SCDH 遺伝子を含む cDNA 及び変異 SCDH 遺伝子を含む DNA の塩基配列を決定した。塩基配列の決定に際しては、Applied Biosystems 社の BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit を用いた。

このキットを用いたシーケンス反応は、鋳型の RT-PCR 或いは PCR 産物、3.2pmol のプライマー(プライマー1, プライマー3, プライマー5 及びプライマー6)及び8 μ l の terminator pre-mix を混合して総量20 μ l の反応溶液中で行った。反応条件としては、96℃で10秒、50℃で5秒及び60℃で4分からなるステップを40サイクル繰り返し、最終サイクルの後、60℃で7分間反応を完結させた。反応終了後、反応溶液に残存するダイターミネータ等の成分を Auto Seq G-50 (Amersham Bioscience 社製)を用いたゲル濾過により除去した。その後、反応生成物を Applied Biosystems 社の ABI 310 Genetic Analyzer で解析して塩基配列決定した。RT-PCR 産物を鋳型として決定した変異 SCDH 遺伝子の塩基配列を配列番号1に示し、変異 SCDH 遺伝子によりコードされる変異 SCDH 酵素のアミノ酸配列を配列番号2に示す。

RT-PCR 産物を鋳型として変異 SCDH 遺伝子の cDNA について解析した結果を図3に示した。図3は遺伝子バンクに登録されているいもち病菌の SCDH 遺伝子の塩基配列(登録番号 AB004741、上段)と、標準菌株から得られた RT-PCR 産物を用いて解析された SCDH 遺伝子の塩基配列(中段)と、抵抗性株 A から得られた RT-PCR 産物を用いて解析された変異 SCDH 遺伝子の塩基配列(下段)とを比較した図である。

また、PCR 産物を鋳型として、ゲノム DNA に存在する変異 SCDH 遺伝子について解析した結果を図4に示した。図3は遺伝子バンクに登録されているいもち病菌の SCDH 遺伝子の塩基配列(登録番号 AB004741、上段)と、標準菌株から得られた PCR 産物を用いて解析された SCDH 遺伝子の塩基配列(中段)と、抵抗性株 A から得られた PCR 産物を用いて解析された変異 SCDH 遺伝子の塩基配列(下段)とを比較した図である。

これら図3及び図4から、抵抗性株 A においては、SCDH 遺伝子の cDNA 塩基配列における223番目のG(グアノシン)がA(アデノシン)にホモに変異していること

が判った。これは、標準菌株の SCDH 酵素のアミノ酸配列における 75 番目のバリン(Val)がメチオニン(Met)へ変異することを意味していた。また cDNA 塩基配列における 450 番目の塩基が登録されている塩基配列(登録番号 AB004741、図 3 において上段)では T(チミジン)であったが、標準菌株及び抵抗性株では C(シチジン)であった。但しこの cDNA 塩基配列における 450 番目の塩基の変異は、アミノ酸変異を伴っていないので、SCDH 阻害剤に対する感受性には何ら関与していないと考えられる。

また、図 4 から、配列番号 3 に示した塩基配列における 42 番目と 43 番目の間及び 141 番目と 142 番目の間に、それぞれ 81 塩基と約 89 塩基のイントロンを確認した。後者はポリ A 鎖が連なっていたため、PCR を行った際、長さの異なるものが生成してきてしまい明確な長さは確認できなかったため、約 89 塩基となっている。

実施例 3

いもち病菌の SCDH 酵素における、75 番目のバリン(Val)からメチオニン(Met)への変異(以下、Val75Met 変異と呼ぶ)の簡易検定法を検討した。

オートミール培地(5%オートミール、2%シュークロース及び 1.5%寒天)上、28℃で生育させたイネいもち菌の菌体を爪楊枝で取り、1.5 µl のマイクロチューブに移した。蓋をして、電子レンジ(600W)で 5~7 分、マイクロウェーブを照射した。この処理によって、菌体の細胞壁を破壊した。

次に、マイクロチューブ内に 50 µl の TE バッファー(pH8.0)を加え、激しく攪拌し、14,000rpm で 10 分間遠心分離した。遊離したゲノム DNA が溶け込んだ上澄み中を、別のマイクロチューブに移し、-20℃で保存した。1~5 µl の上澄みを、最終容量が 25 µl となるように、各々 1 µl のプライマー 4(5'-ATGGGTTCGCAAGTTCAAAAG-3', 25pmol/ µl)、プライマー 5(5'-GTGGCCCTTCATGGTGACCTCCT-3', 25pmol/ µl)及び PCR bead (Amersham Biosciences 社製)と混合して反応溶液を調製した。PCR 反応としては、95℃で 30 秒、55℃で 1 分及び 72℃で 2 分からなるステップを 40 サイクル繰り返し、最終サイクルの後、72℃で 7 分間反応を完結させた。反応溶液を Invisorb Spin PCRapid

Kit (Invitex 社製) を用いて精製し、PCR 産物を得た。反応溶液に含まれる PCR 産物は、Applied Biosystems 社の BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit を用いてシーケンス反応を行った。

シーケンス反応に際しては、鋳型となる PCR 産物、3.2pmol のプライマー 6 (5'-ACAAGCTCTGGGAGGCAATG-3') 及び 8 μ l の terminator pre-mix を混合し、総量 20 μ l の反応溶液を調製した。シーケンス反応としては、96°C で 10 秒、50°C で 5 秒及び 60°C で 4 分からなるステップを 40 サイクル繰り返し、最終サイクルの後、60°C で 7 分間反応を完結させた。反応終了後、反応溶液に残存するダイターミネータ等を Auto Seq G-50 (Amersham Biosciences 社製) を用いたゲル濾過により除去した。その後、反応生成物を同社の ABI 310 Genetic Analyzer でシーケンス解析した。この際、Amersham Biosciences 社製の 47cm x 50 μ m のショートキャピラリーカラムを用いることにより、1 サンプル当たり約 35 分という短時間で 75 番目のアミノ酸がバリンからメチオニンに変異していることを判定できた。

実施例 4

一本鎖 DNA 高次構造多型 (SSCP) 解析法を適用した、いもち病菌の SCDH 酵素における、75 番目のバリン (Val) からメチオニン (Met) への変異 (以下、Val75Met 変異と呼ぶ) の簡易検定法を検討した。

実施例 3 と同様に、いもち病菌糸状菌糸体をマイクロウェーブ照射してゲノム DNA 溶液を簡易に調製した。このゲノム DNA 溶液 5 μ l を、最終容量が 25 μ l となるように、各々 1 μ l のプライマー 6 (5'-ACAAGCTCTGGGAGGCAATG-3', 25pmol/ μ l)、プライマー 5 (5'-GTGGCCCTTCATGGTGACCTCCT-3', 25pmol/ μ l) 及び PCR bead (Amersham Biosciences 社製) と混合して反応溶液を調製した。PCR 反応としては、95°C で 30 秒、55°C で 1 分及び 72°C で 2 分からなるステップを 40 サイクル繰り返し、最終サイクルの後、72°C で 7 分間反応を完結させた。この反応の結果、215bp の PCR 生成物を得た。GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences 社製) を用いて、反応溶液に残存する taq DNA polymerase やプライマー等を除去した。

その後、SSCP のための loading buffer として、0.5M EDTA (pH8.0) 0.4ml、プロ

モフェノールブルー10mg 及びホルムアミド 10ml を混合したものを調製した。反応溶液と loading buffer とを 1:1 で混合し、85℃で 15 分加熱した後、一気に氷冷した。これにより、反応溶液に含まれる PCR 産物を一本鎖 DNA とした。

次に、反応溶液及び loading buffer の混合液を用いて、Amersham Biosciences 社の PhastSystem 全自動電気泳動システムで電気泳動を行った。ゲル担体及びバッファー試薬として、同社の PhastGel Homogeneous 12.5 と PhastGel Native Buffer Strips を使い、400V、10mA、2.5W、4℃、100Vh で前泳動した後、400V、10mA、2.5W、4℃、200Vh 本泳動した。その結果を図 6 A 及び B に示した。なお、図 6 A は、上述した GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit を用いた精製を行わずに上記電気泳動を行った場合の結果である。図 6 B は、上述した GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit を用いて精製を行った後に上記電気泳動を行った場合の結果である。

図 6 A 及び B それぞれの一本鎖 DNA の泳動パターンが異なるが、これは PCR 溶液中のバッファー組成によるものと考えられる。いずれにしろ、図 6 A 及び B から標準菌株とカルプロパミド耐性菌株では泳動パターンに違いが見られ、それぞれを識別することが可能であった。

実施例 5

変異 SCDH 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを構築し、SCDH 阻害剤に対する抵抗性を検討した。

タンパク質発現ベクターである pGEX-2T (Amersham Biosciences 社製) にいもち病菌のシタロン脱水酵素遺伝子を組み込むため、Eco RI 切断部位を末端に有するプライマー 7 (5'-ATCGTCGACGTGAATTCGTCTTGTAAGCCGCAAC-3') とプライマー 3 (5'-AGTTCGAACTGGAATTCAACCGGCACGCATGATGCATGCATTTA-3') を使い RT-PCR を行った。この RT-PCR は、実施例 1 に記載した方法に準じて行った。プライマー 7 及び 3 は、それぞれ SCDH 遺伝子の読み枠 (ORF) の上流及び下流に位置し、SCDH 酵素のコード領域全てを挟み込んでいる。

RT-PCR を行う際には、まず、標準 (野性) 菌或いはカルプロパミド耐性いもち菌から抽出した全量 RNA (各々 2 µg) を、2 µl の oligo (dT)₂₀ (10 pmol/µl) と、各々

2 μ l のプライマー4 (25pmol/ μ l) 及びプライマー3 (25pmol/ μ l) と、RT-PCR bead (Amersham Biosciences 社製) とを混合し、最終容量 50 μ l の反応溶液を調製した。反応は以下の条件によって行った。反応溶液を 42°C で 30 分、続いて 95°C で 30 分反応して cDNA 鎖を合成した。その後、引き続いて 95°C で 30 秒、55°C で 1 分及び 72°C で 1 分からなるステップを 25 サイクル繰り返して PCR 反応を行った。反応終了後、反応溶液を GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences 社製) を用いて RT-PCR 生成物を精製し、その後、最終 50 μ l の滅菌水で溶出した。

次に、RT-PCR 生成物を含む溶液のうち 30 μ l を、10 x H 緩衝液 (Takara 社製) 4 μ l、Eco RI 1 μ l (12u/ μ l、Takara 社製) と混合して最終容量 40 μ l とし、37°C で 2 時間制限酵素反応に供した。制限酵素反応後、反応溶液を GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences 社製) で精製し、30 μ l の滅菌水で溶出した。

一方、GST 融合タンパク発現ベクターである pGEX-2T (Amersham Biosciences 社製) 1 μ g を 10 x H 緩衝液 (Takara 社製) 1 μ l 及び Eco RI 1 μ l (12u/ μ l、Takara 社製) と混合して最終容量 10 μ l とし、37°C で 1 時間制限酵素反応に供した。この反応液に BAP 緩衝液 10 μ l (TOYOBO 社製)、アルカリフォスファターゼ 2.5 μ l (0.4u/ μ l, BAP-101, TOYOBO 社製) 及び滅菌水 77.5 μ l を加え、37°C で 2 時間脱リン酸化反応に供した。

次に、2 μ l の Eco RI 消化された RT-PCR 生成物、1 μ l の Eco RI/BAP 処理された pGEX-2T、2 μ l の滅菌水及び 5 μ l のライゲーション緩衝液 I 液 (Ver. 2, Takara 社製) と混合して反応液を調製し、16°C で 12 時間ライゲーション反応に供した。反応終了後、大腸菌 (JM109 株) のコンピテントセル (Takara 社製) に添付されているプロトコルに従い、反応液を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換した。次に、形質転換された大腸菌 JM109 株を、アンピシリン 50ppm を含む LB 固体培地上に広げ、37°C で 12 時間静置培養した。培養後、数点のシングルコロニーを掻き取り、ダイレクトコロニーPCR を行った。そして、ダイレクトコロニーPCR の結果、目的の方向に SCDH 遺伝子が挿入された pGEX-2T をスクリーニングし、更に、塩基配列を決定することによって、挿入された SCDH 遺伝子の塩基配列に間違いがないかを確認

した。以上の方法の概略を図 7 に示した。また、以上の方法で得られたプラスミドは Rice Blast Mutant SCDH cDNA (FERM BP-7948) として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に、平成 2002 年 3 月 8 日付けでブタペスト条約に基づき国際寄託した。

次に、SCDH 遺伝子が正しく挿入された pGEX-2T ベクターで形質転換された大腸菌を、50ppm アンピシリンを含む LB 液体培地 200ml で OD₂₆₀ が 0.6~1.0 になるまで 27℃ で培養した。その後、イソプロピル 1-チオ-β-D-ガラクトシド (IPTG) を最終濃度 1mM になるように添加し、更に 27℃ で 5 時間激しく攪拌培養した。培養後、遠心 (10,000 x g, 10 分, 4℃) により大腸菌を集菌した。大腸菌を洗浄するため、冷却した 1/15M リン酸カリウム緩衝液 (pH6.8) 10ml に一度懸濁させた後、再度遠心 (10,000 x g, 10 分, 4℃) により大腸菌を集菌した。その後、再度、冷却した 1/15M リン酸カリウム緩衝液 (pH6.8) 5ml に懸濁し、氷冷しながらマイクロチップで超音波処理した後、4℃、15,000 x g で 20 分遠心し、その上澄を粗酵素溶液とした。

この粗酵素溶液を用いて、カルプロパミドに対する感受性を測定した。カルプロパミドに対する感受性は、上述した実施例 1 と同様にして測定した。その結果を図 8 に示した。なお図 8 において、白抜きの円を結んだグラフ及び塗りつぶしの円を結んだグラフは、実施例 1 において測定したカルプロパミドに対する感受性の測定結果である。

図 8 から、大腸菌中で発現させた GST 融合 SCDH 酵素は、標準菌とカルプロパミド耐性菌の両方ともに、いもち病菌から抽出した粗酵素液に含まれる SCDH 酵素と同じ薬剤感受性を示した。

さらに、SCDH 阻害剤としてフェノキサニル及びジクロシメットについても同様に感受性を検討した。結果を図 9 に示す。

図 9 より、GST 融合 SCDH 酵素は、これらフェノキサニル及びジクロシメットに対しても耐性を示すことが判った。すなわち、これら図 8 及び図 9 に示した結果から、GST 融合 SCDH 酵素は、様々な SCDH 阻害剤の存在下において高い酵素活性を示すことが明らかとなった。したがって、SCDH 阻害剤の存在下においてもイネに対して高い感染力を示す耐性いもち病菌を防除する薬剤を発見・開発する際に、

GST 融合 SCDH 酵素を用いて候補物質のスクリーニングを行うことができる。詳細には、候補物質の存在下において、GST 融合 SCDH 酵素の酵素活性を測定し、当該酵素活性を有意に低下させた候補物質を選択する。選択された候補物質は、変異 SCDH 酵素の酵素活性を低下させ、耐性いもち病菌の感染力を低下させる。これによって、耐性いもち病菌に起因するいもち病の発生を防止できる

実施例 6

いもち病菌の SCDH 酵素における、Val75Met 変異の簡易検定法について、PCR-RFLP 法を応用して検討した。実施例 3 と同様に、いもち病菌糸状菌糸をマイクロウェーブ照射してゲノム DNA 溶液を簡易に調製した。このゲノム DNA 溶液 $5\mu\text{l}$ を、最終容量が $25\mu\text{l}$ となるように、各々 $1\mu\text{l}$ のプライマー 8 (配列番号 12、5'-TTCGTCGGCATGGTCTCGAGCATCTAG-3', $25\text{pmol}/\mu\text{l}$)、プライマー 5 (5'-GTGGCCCTTCATGGTGACCTCCT-3', $25\text{pmol}/\mu\text{l}$) 及び PCR bead (Amersham Bioscience 社製) と混合して反応溶液を調製した。

プライマー 8 中の下線を付した塩基「TCT」は、鋳型となるゲノム DNA の塩基配列とはミスマッチであり、3' 側に隣接する塩基「AG」と後述の PCR により増幅される最初の塩基とともに、制限酵素 Xba I の切断認識部位（「TCTAGA」）となりうるために設計された配列である。すなわち、PCR により増幅される最初の塩基が A である場合には、プライマー 8 により増幅される断片には、制限酵素 Xba I の切断認識部位が含まれることとなる。一方、PCR により増幅される最初の塩基が A 以外である場合には、増幅断片に制限酵素 Xba I の切断認識部位が存在しないこととなる。

PCR 反応としては、 95°C で 30 秒、 55°C で 1 分及び 72°C で 2 分からなるステップを 40 サイクル繰り返し、最終サイクルの後、 72°C で 7 分間反応を完結させた。この反応の結果、183bp の PCR 生成物を得た。GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences 社製) を用いて、PCR 生成物を精製し、その後、最終 $20\mu\text{l}$ の滅菌水で溶出した。この内、 $7.5\mu\text{l}$ を、 $10\times\text{M}$ 緩衝液 (Takara 社製) $1\mu\text{l}$ 、0.1%BSA 溶液 $1\mu\text{l}$ 、Xba I $0.5\mu\text{l}$ ($12\text{u}/\mu\text{l}$ 、Takara 社製) と混合して最終容量 $10\mu\text{l}$ とし、 37°C で 1 時間制限酵素反応に供した。反応液全量を 3%アガロースに泳

動した結果を図 10 に示した。なお、図 10 において、レーン 2 は標準菌株から抽出したゲノム DNA を用いた反応液であり、レーン 3 は抵抗性菌株から抽出したゲノム DNA を用いた反応液であり、レーン 4 は標準菌株から抽出したゲノム DNA を用い制限酵素反応を行わなかった反応液であり、レーン 5 は抵抗性菌株から抽出したゲノム DNA を用い制限酵素反応を行わなかった反応液である。

図 10 より明らかなように、抵抗性株由来の PCR 生成物の Xba I 処理サンプルでは 25 塩基程短い断片となっていた。この結果から、標準菌株（野性株）と抵抗性菌株の区別が PCR—RFLP 法を応用して可能であることが明らかとなった。

産業上の利用の可能性

以上、詳細に説明したように、本発明によれば、SCDH 阻害剤に対する耐性いもち病菌に関する研究等に広範囲に使用することができる遺伝子を提供することができる。また、この遺伝子は、新規な SCDH 阻害剤のスクリーニングや、解析対象のいもち病菌における SCDH 阻害剤に対する感受性の評価等に使用することができる。

配列表フリーテキスト

配列番号 5 ～ 12 は、合成プライマーである。

請求の範囲

(1) 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号2に示すアミノ酸配列における1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、シタロン脱水酵素阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すタンパク質。

(2) 上記シタロン脱水酵素阻害剤は、メラニン生合成経路におけるシタロンから1,3,8-トリヒドロキシナフタレンへの脱水反応を阻害することを特徴とする請求の範囲1記載の遺伝子。

(3) 上記シタロン脱水酵素阻害剤は、カルプロパミドであることを特徴とする請求の範囲1記載の遺伝子。

(4) 請求の範囲1記載の遺伝子によりコードされるシタロン脱水酵素。

(5) 請求の範囲1記載の遺伝子を含む組換えベクター。

(6) 請求の範囲5記載の組換えベクターを形質転換してなる形質転換体。

(7) 以下の工程を有するいもち病菌のシタロン脱水酵素阻害剤に対する感受性評価方法。

(a) 評価対象のいもち病菌におけるシタロン脱水酵素のアミノ酸配列における、配列番号4に示すアミノ酸配列の75番目のバリンに相当するアミノ酸を同定する工程。

(b) 上記(a)工程の結果に基づいて、評価対象のいもち病菌のシタロン脱水酵素阻害剤に対する感受性を評価する工程。

(8) 上記(b)工程では、上記(a)工程で同定した上記アミノ酸がメチオニンである場合に、野生型のいもち病菌と比較して、評価対象のいもち病菌がシタロン脱水酵素阻害剤に対して低い感受性を示すと評価することを特徴とする請求の範囲7記載の感受性評価方法。

(9) 請求の範囲4記載のシタロン脱水酵素を含む、阻害剤スクリーニングキット。

(10) 配列番号4で示すアミノ酸配列における75番目のバリンに相当するアミノ酸をコードする塩基配列を挟むように設計した一対のプライマーを備え

る、シタロン脱水酵素阻害剤抵抗性いもち病菌評価キット。

(11) 配列番号4で示すアミノ酸配列における75番目のバリンに相当するアミノ酸をコードする塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを備える、シタロン脱水酵素阻害剤抵抗性いもち病菌評価キット。

図 1

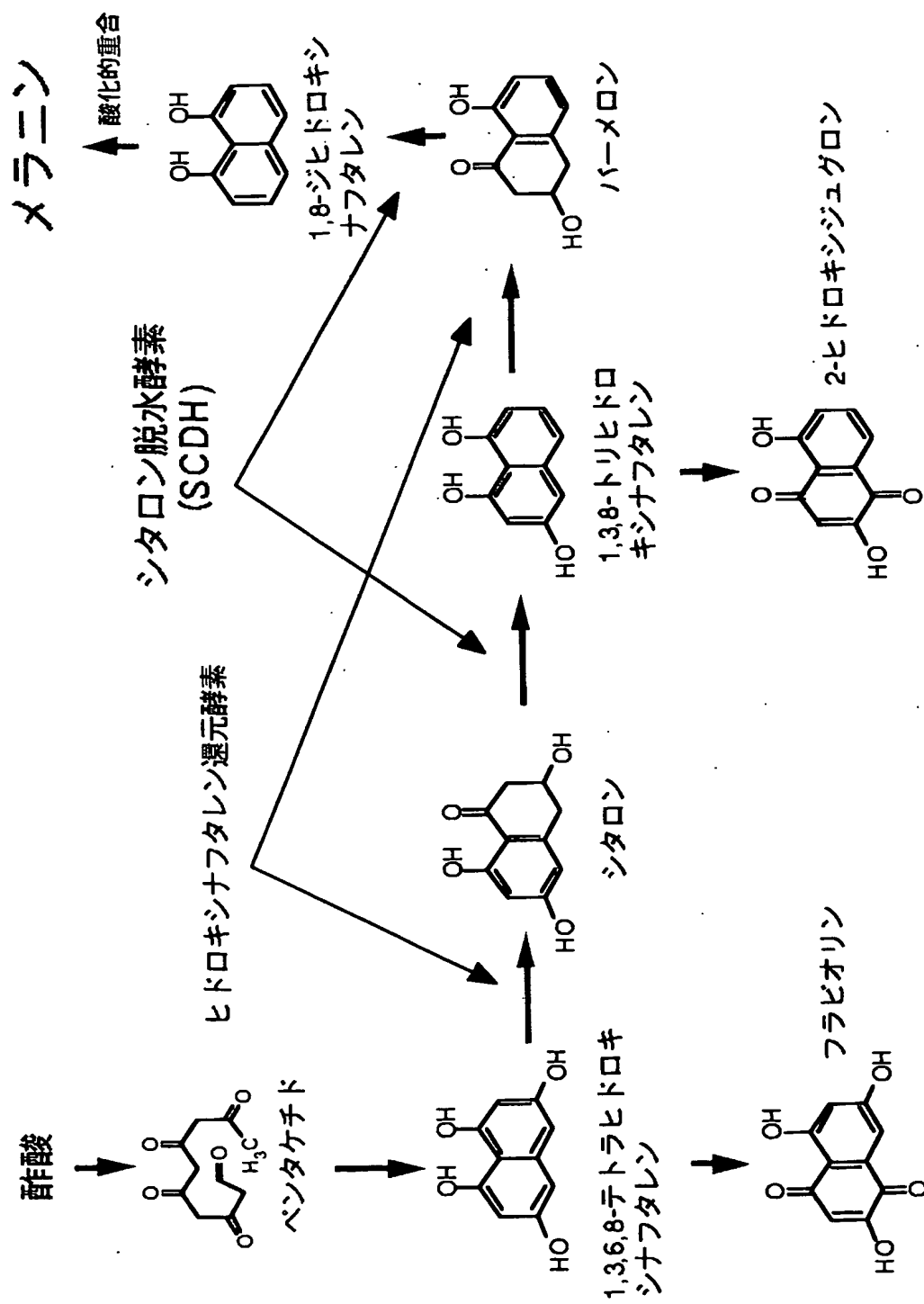


図 2

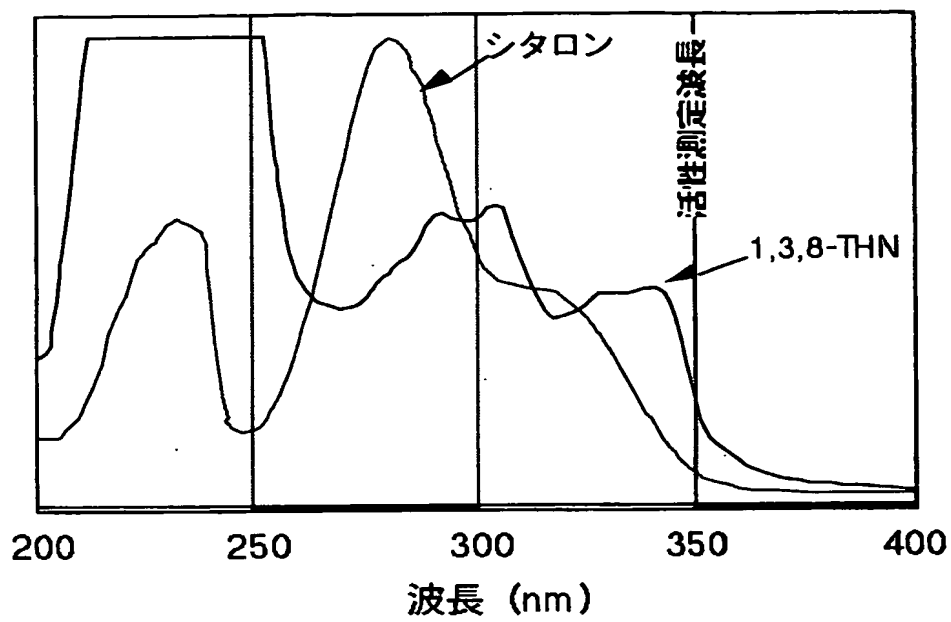


図 3

P. oryzae AB004741	-80	CTAGCAACCGCAGTGATACCCACACCAAAGAGCTTCCTTCAGTCTAGTATAGTTCACTTC	-21
標準菌株	-37	-----CTAGTATAGTTCACTTC	-21
抵抗性株	-30	-----AGTTCACTTC	-21
	*****	
P. oryzae AB004741	-20	AACCTTGTAAGAGCCGCCAACATGGGTTTCGCAAGTTCAAAGAGCGATGAGATAACCTTCT	40
標準菌株	-20	AACCTTGTAAGAGCCGCCAACATGGGTTTCGCAAGTTCAAAGAGCGATGAGATAACCTTCT	40
抵抗性株	-20	AACCTTGTAAGAGCCGCCAACATGGGTTTCGCAAGTTCAAAGAGCGATGAGATAACCTTCT	40

P. oryzae AB004741	41	CAGACTACCTGGGCCTCATGACTTGCGTCTATGAGTGGGCAGACAGCTACGACTCCAAGG	100
標準菌株	41	CAGACTACCTGGGCCTCATGACTTGCGTCTATGAGTGGGCAGACAGCTACGACTCCAAGG	100
抵抗性株	41	CAGACTACCTGGGCCTCATGACTTGCGTCTATGAGTGGGCAGACAGCTACGACTCCAAGG	100

P. oryzae AB004741	101	ACTGGGATAGGCTGCGAAAGGTCATTGCGCCTACTCTGCGCATTGACTACCGCTCCTTCC	160
標準菌株	101	ACTGGGATAGGCTGCGAAAGGTCATTGCGCCTACTCTGCGCATTGACTACCGCTCCTTCC	160
抵抗性株	101	ACTGGGATAGGCTGCGAAAGGTCATTGCGCCTACTCTGCGCATTGACTACCGCTCCTTCC	160

P. oryzae AB004741	161	TCGACAAGCTCTGGGAGGCAATGCCGGCCGAGGAGTTCGTTCGGCATGGTCTCGAGCAAGC	220
標準菌株	161	TCGACAAGCTCTGGGAGGCAATGCCGGCCGAGGAGTTCGTTCGGCATGGTCTCGAGCAAGC	220
抵抗性株	161	TCGACAAGCTCTGGGAGGCAATGCCGGCCGAGGAGTTCGTTCGGCATGGTCTCGAGCAAGC	220

P. oryzae AB004741	221	AGGTGCTGGGCGACCCACCTCCGCACGCAGCACTTCATCGGCGGCACGCGCTGGGAGA	280
標準菌株	221	AGGTGCTGGGCGACCCACCTCCGCACGCAGCACTTCATCGGCGGCACGCGCTGGGAGA	280
抵抗性株	221	AGATGCTGGGCGACCCACCTCCGCACGCAGCACTTCATCGGCGGCACGCGCTGGGAGA	280
		** *****	
P. oryzae AB004741	281	AGGTGTCCGAGGACGAGGTTCATCGGCTACCACCAGCTGCGCGTCCCGCACCAGAGGTACA	340
標準菌株	281	AGGTGTCCGAGGACGAGGTTCATCGGCTACCACCAGCTGCGCGTCCCGCACCAGAGGTACA	340
抵抗性株	281	AGGTGTCCGAGGACGAGGTTCATCGGCTACCACCAGCTGCGCGTCCCGCACCAGAGGTACA	340

P. oryzae AB004741	341	AGGACACCACCATGAAGGAGGTACCATGAAGGGCCACGCCCACTCGGCAAACCTTCACT	400
標準菌株	341	AGGACACCACCATGAAGGAGGTACCATGAAGGGCCACGCCCACTCGGCAAACCTTCACT	400
抵抗性株	341	AGGACACCACCATGAAGGAGGTACCATGAAGGGCCACGCCCACTCGGCAAACCTTCACT	400

P. oryzae AB004741	401	GGTACAAGAAGATCGACGGCGTCTGGAAGTTGCGCGGCCTCAAGCCGACATCCGCTGGG	460
標準菌株	401	GGTACAAGAAGATCGACGGCGTCTGGAAGTTGCGCGGCCTCAAGCCGACATCCGCTGGG	460
抵抗性株	401	GGTACAAGAAGATCGACGGCGTCTGGAAGTTGCGCGGCCTCAAGCCGACATCCGCTGGG	460

P. oryzae AB004741	461	GCGAGTTCGACTTTGACAGGATCTTTGAGGACGGACGGGAGACCTTTGGCGACAAATAAA	520
標準菌株	461	GCGAGTTCGACTTTGACAGGATCTTTGAGGACGGACGGGAGACCTTTG-----	508
抵抗性株	461	GCGAGTTCGACTTTGACAGGATCTTTGAGGACGGACGGGAGACCTTTG-----	508

図 4

P. oryzae AB004741	380	CTAGCAACCGCAGTGATACCCACACCAAAGAGCTTCCTTCAGTCTAGTATAGTTCACTTC	-21
標準菌株	-46	-----TCCTTCAGTCTAGTATAGTTCACTTC	-21
抵抗性株	-47	-----TCCTTCAGTCTAGTATAGTTCACTTC	-21

P. oryzae AB004741	-20	AACTTGTAAGAGCCGCCAACATGGGTTGCAAGTTCAAAAGAGCGATGAGATAACCTTCT	40
標準菌株	-20	AACTTGTAAGAGCCGCCAACATGGGTTGCAAGTTCAAAAGAGCGATGAGATAACCTTCT	40
抵抗性株	-20	AACTTGTAAGAGCCGCCAACATGGGTTGCAAGTTCAAAAGAGCGATGAGATAACCTTCT	40

P. oryzae AB004741	41	CA-----	42
標準菌株	41	CAGGTGAGCATAATATCCCCCTCCAAAAGAAAATAGCGGTGAAGCCACCAACGACAGTA	100
抵抗性株	41	CAGGTGAGCATAATATCCCCCTCCAAAAGAAAATAGCGGTGAAGCCACCAACGACAGTA	100
		**.....	
P. oryzae AB004741	43	-----GACTACCTGGGCCTCATGACTTGCCTCTATGAGTGGG	79
標準菌株	101	CCGCTGACCCTAATTCCTCCAGACTACCTGGGCCTCATGACTTGCCTCTATGAGTGGG	160
抵抗性株	101	CCGCTGACCCTAATTCCTCCAGACTACCTGGGCCTCATGACTTGCCTCTATGAGTGGG	160

P. oryzae AB004741	80	CAGACAGCTACGACTCCAAGGACTGGGATAGGCTGCGAAAGGTCATTGCGCCTACTCTGC	139
標準菌株	161	CAGACAGCTACGACTCCAAGGACTGGGATAGGCTGCGAAAGGTCATTGCGCCTACTCTGC	220
抵抗性株	161	CAGACAGCTACGACTCCAAGGACTGGGATAGGCTGCGAAAGGTCATTGCGCCTACTCTGC	220

P. oryzae AB004741	140	GC-----	141
標準菌株	221	GCGTATGTTCCGCCCTGCCATGTTTATTTTTACTTTCCACACCAAATCCAGACTTTAAAC	280
抵抗性株	221	GCGTATGTTCCGCCCTGCCATGTTTATTTTTACTTTCCACACCAAATCCAGACTTTAAAC	280
		**.....	
P. oryzae AB004741	142	-----ATTGACTACCGCTCCTTCCTCGACAAGCT	170
標準菌株	281	AGCGACGACCAAAAAAAAAAAAAAAAAACAGATTGACTACCGCTCCTTCCTCGACAAGCT	340
抵抗性株	328	AGCGACGACCAAAAAAAAAAAAAA---CAGATTGACTACCGCTCCTTCCTCGACAAGCT	336

P. oryzae AB004741	171	CTGGGAGGCAATGCCGGCCGAGGAGTTCGTCCGCATGGTCTCGAGCAAGCAGGTGCTGGG	230
標準菌株	341	CTGGGAGGCAATGCCGGCCGAGGAGTTCGTCCGCATGGTCTCGAGCAAGCAGGTGCTGGG	400
抵抗性株	337	CTGGGAGGCAATGCCGGCCGAGGAGTTCGTCCGCATGGTCTCGAGCAAGCAGATGCTGGG	396

P. oryzae AB004741	231	CGACCCCAACCTCCGCACGCAGCACTTCATCGGCGGCACGCGCTGGGAGAAGGTGTCCGA	290
標準菌株	401	CGACCCCAACCTCCGCACGCAGCACTTCATCGGCGGCACGCGCTGGGAGAAGGTGTCCGA	460
抵抗性株	397	CGACCCCAACCTCCGCACGCAGCACTTCATCGGCGGCACGCGCTGGGAGAAGGTGTCCGA	456

P. oryzae AB004741	291	GGACGAGGTCATCGGCTACCACCAGCTGCGCGTCCCGCACCAGAGGTACAAGGACACCAC	350
標準菌株	461	GGACGAGGTCATCGGCTACCACCAGCTGCGCGTCCCGCACCAGAGGTACAAGGACACCAC	520
抵抗性株	457	GGACGAGGTCATCGGCTACCACCAGCTGCGCGTCCCGCACCAGAGGTACAAGGACACCAC	516

P. oryzae AB004741	351	CATGAAGGAGGTCACCATGAAGGGCCACGCCCACTCGGCAAACCTTCACTGGTACAAGAA	410
標準菌株	521	CATGAAGGAGGTCACCATGAAGGGCCACGCCCACTCGGCAAACCTTCACTGGTACAAGAA	580
抵抗性株	517	CATGAAGGAGGTCACCATGAAGGGCCACGCCCACTCGGCAAACCTTCACTGGTACAAGAA	576

P. oryzae AB004741	411	GATCGACGGCGTCTGGAAGTTCCGCCGCCCTCAAGCCCGATATCCGCTGGGGCGAGTTCGA	470
標準菌株	581	GATCGACGGCGTCTGGAAGTTCCGCCGCCCTCAAGCCCGACATCCGCTGGGGCGAGTTCGA	640
抵抗性株	577	GATCGACGGCGTCTGGAAGTTCCGCCGCCCTCAAGCCCGACATCCGCTGGGGCGAGTTCGA	636

P. oryzae AB004741	471	CTTTGACAGGATCTTTGAGGACGGACGGGAGACCTTTGGCGACAAATGATGCATC	530
標準菌株	641	CTTTGACAGGATCTTTGAGGACGGACGGGAGACCTTTGGCGACAA	700
抵抗性株	637	CTTTGACAGGATCTTTGAGGACGGACGGGAGACCTTTGGCGACAA	696

図 5

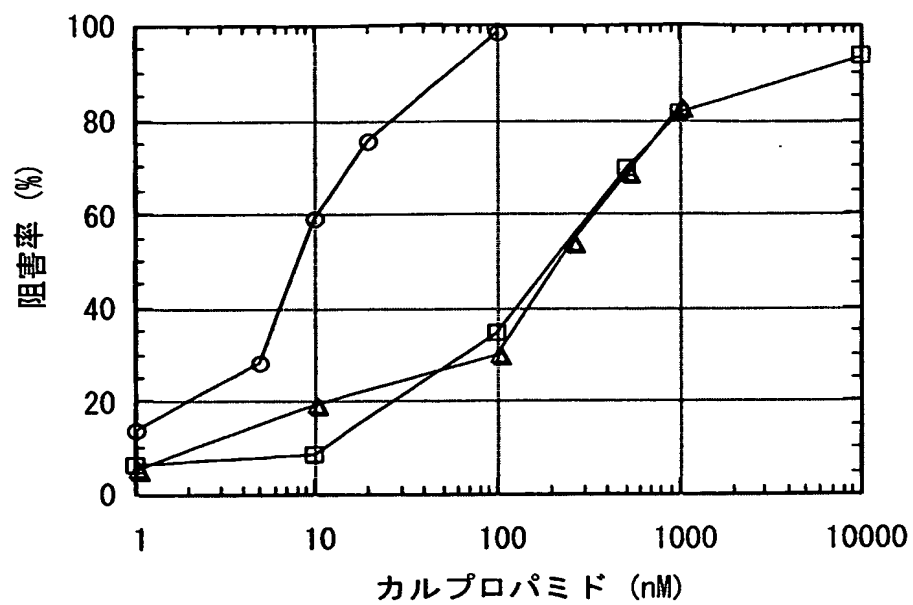
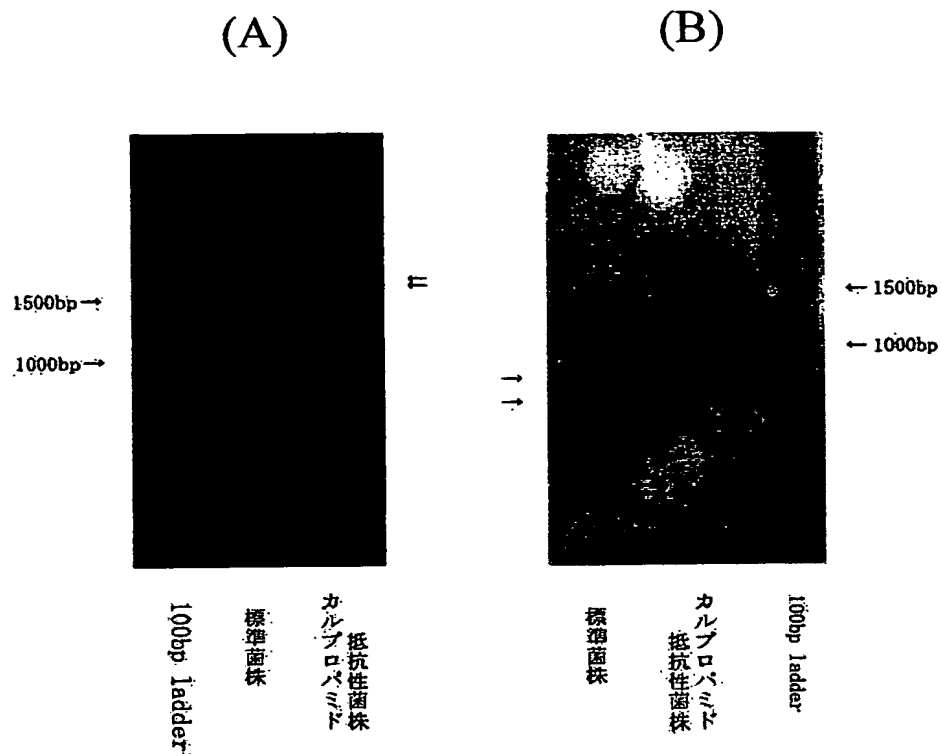


図 6



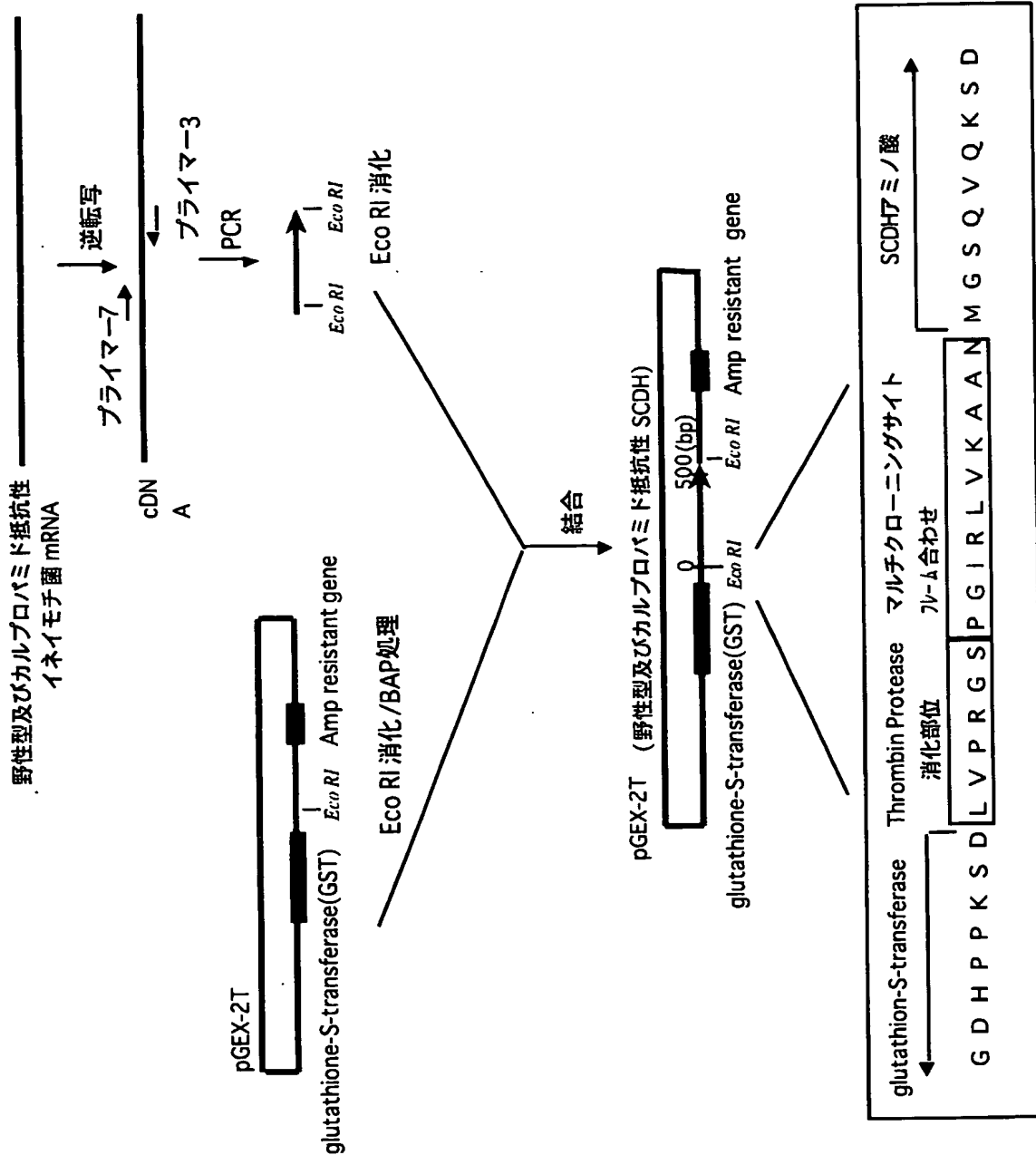


図 8

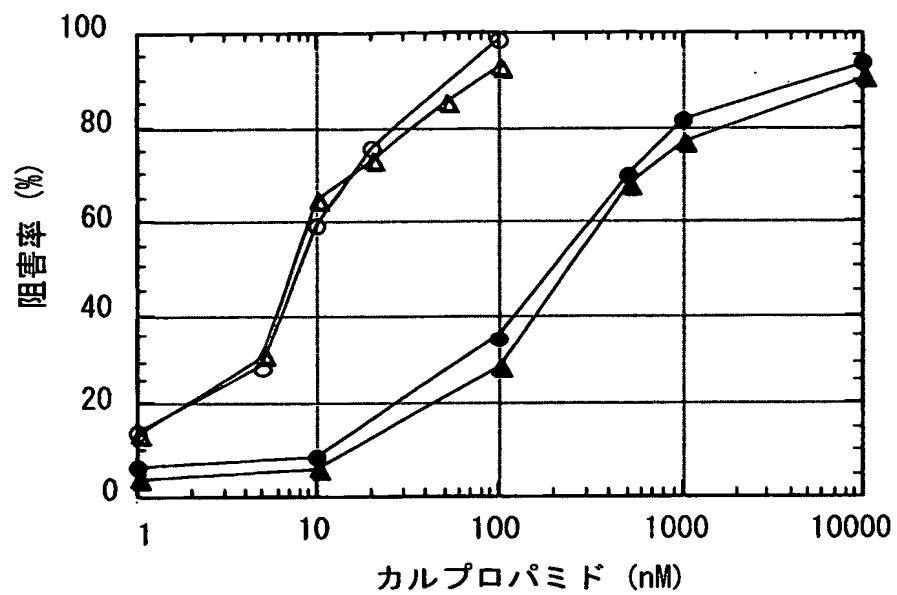


図 9

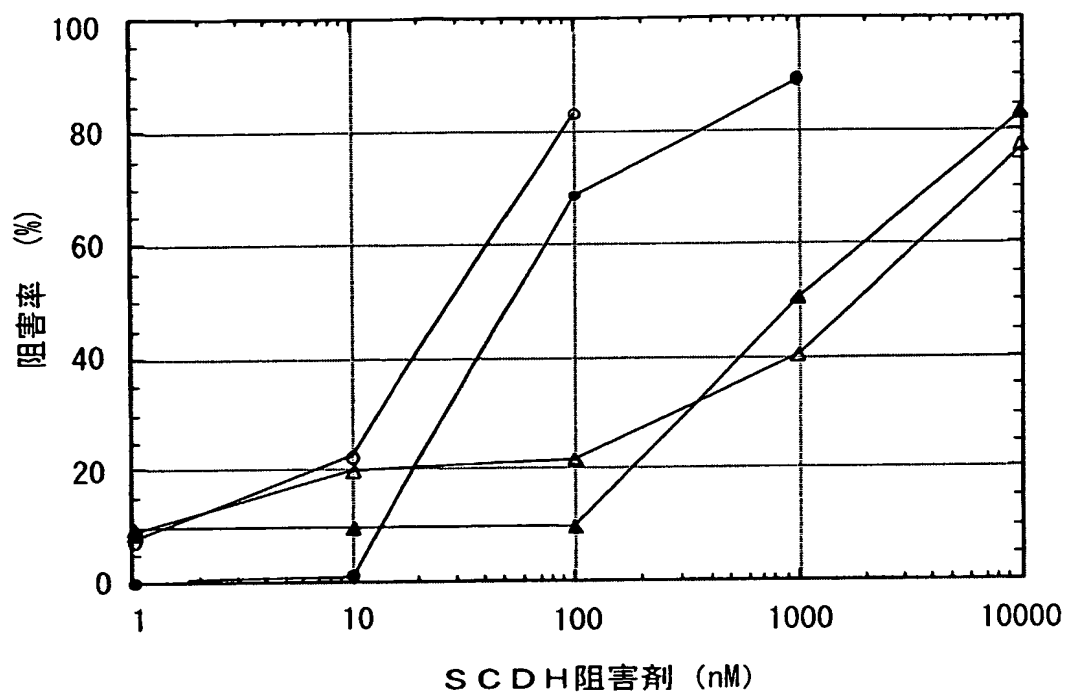
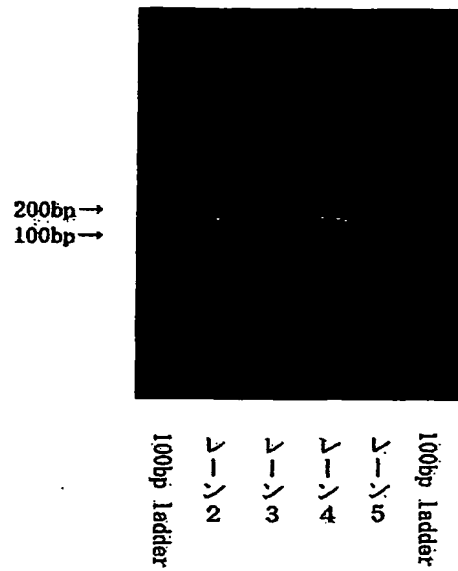


図 10



BEST AVAILABLE COPY

SEQUENCE LISTING

<110> KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD

<120> A gene coding for scytalone dehydratase having conferring
resistance to an agricultural fungicidal agent

<130> PH-1735-PCT

<150> JP 2002-66955

<151> 2002-03-12

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 516

<212> DNA

<213> Pyricularia oryzae

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (516)

<400> 1

atg ggt tcg caa gtt caa aag agc gat gag ata acc ttc tca gac tac 48

Met Gly Ser Gln Val Gln Lys Ser Asp Glu Ile Thr Phe Ser Asp Tyr

1

5

10

15

ctg ggc ctc atg act tgc gtc tat gag tgg gca gac agc tac gac tcc 96
Leu Gly Leu Met Thr Cys Val Tyr Glu Trp Ala Asp Ser Tyr Asp Ser
20 25 30

aag gac tgg gat agg ctg cga aag gtc att gcg cct act ctg cgc att 144
Lys Asp Trp Asp Arg Leu Arg Lys Val Ile Ala Pro Thr Leu Arg Ile
35 40 45

gac tac cgc tcc ttc ctc gac aag ctc tgg gag gca atg ccg gcc gag 192
Asp Tyr Arg Ser Phe Leu Asp Lys Leu Trp Glu Ala Met Pro Ala Glu
50 55 60

gag ttc gtc ggc atg gtc tcg agc aag cag atg ctg ggc gac ccc acc 240
Glu Phe Val Gly Met Val Ser Ser Lys Gln Met Leu Gly Asp Pro Thr
65 70 75 80

ctc cgc acg cag cac ttc atc ggc ggc acg cgc tgg gag aag gtg tcc 288
Leu Arg Thr Gln His Phe Ile Gly Gly Thr Arg Trp Glu Lys Val Ser
85 90 95

gag gac gag gtc atc ggc tac cac cag ctg cgc gtc ccg cac cag agg 336
Glu Asp Glu Val Ile Gly Tyr His Gln Leu Arg Val Pro His Gln Arg
100 105 110

tac aag gac acc acc atg aag gag gtc acc atg aag ggc cac gcc cac 384
Tyr Lys Asp Thr Thr Met Lys Glu Val Thr Met Lys Gly His Ala His
115 120 125

tcg gca aac ctt cac tgg tac aag aag atc gac ggc gtc tgg aag ttc 432
Ser Ala Asn Leu His Trp Tyr Lys Lys Ile Asp Gly Val Trp Lys Phe

130

135

140

gcc ggc ctc aag ccc gat atc cgc tgg ggc gag ttc gac ttt gac agg 480
Ala Gly Leu Lys Pro Asp Ile Arg Trp Gly Glu Phe Asp Phe Asp Arg

145

150

155

160

atc ttt gag gac gga cgg gag acc ttt ggc gac aaa 516
Ile Phe Glu Asp Gly Arg Glu Thr Phe Gly Asp Lys

165

170

<210> 2

<211> 172

<212> PRT

<213> *Pyricularia oryzae*

<400> 2

Met Gly Ser Gln Val Gln Lys Ser Asp Glu Ile Thr Phe Ser Asp Tyr

1

5

10

15

Leu Gly Leu Met Thr Cys Val Tyr Glu Trp Ala Asp Ser Tyr Asp Ser

20

25

30

Lys Asp Trp Asp Arg Leu Arg Lys Val Ile Ala Pro Thr Leu Arg Ile

35

40

45

Asp Tyr Arg Ser Phe Leu Asp Lys Leu Trp Glu Ala Met Pro Ala Glu

50 55 60

Glu Phe Val Gly Met Val Ser Ser Lys Gln Met Leu Gly Asp Pro Thr
65 70 75 80

Leu Arg Thr Gln His Phe Ile Gly Gly Thr Arg Trp Glu Lys Val Ser
85 90 95

Glu Asp Glu Val Ile Gly Tyr His Gln Leu Arg Val Pro His Gln Arg
100 105 110

Tyr Lys Asp Thr Thr Met Lys Glu Val Thr Met Lys Gly His Ala His
115 120 125

Ser Ala Asn Leu His Trp Tyr Lys Lys Ile Asp Gly Val Trp Lys Phe
130 135 140

Ala Gly Leu Lys Pro Asp Ile Arg Trp Gly Glu Phe Asp Phe Asp Arg
145 150 155 160

Ile Phe Glu Asp Gly Arg Glu Thr Phe Gly Asp Lys
165 170

<210> 3

<211> 516

<212> DNA

<213> *Pyricularia oryzae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(516)

<400> 3

atg ggt tcg caa gtt caa aag agc gat gag ata acc ttc tca gac tac	48
Met Gly Ser Gln Val Gln Lys Ser Asp Glu Ile Thr Phe Ser Asp Tyr	
1 5 10 15	
ctg ggc ctc atg act tgc gtc tat gag tgg gca gac agc tac gac tcc	96
Leu Gly Leu Met Thr Cys Val Tyr Glu Trp Ala Asp Ser Tyr Asp Ser	
20 25 30	
aag gac tgg gat agg ctg cga aag gtc att gcg cct act ctg cgc att	144
Lys Asp Trp Asp Arg Leu Arg Lys Val Ile Ala Pro Thr Leu Arg Ile	
35 40 45	
gac tac cgc tcc ttc ctc gac aag ctc tgg gag gca atg ccg gcc gag	192
Asp Tyr Arg Ser Phe Leu Asp Lys Leu Trp Glu Ala Met Pro Ala Glu	
50 55 60	
gag ttc gtc ggc atg gtc tcg agc aag cag gtg ctg ggc gac ccc acc	240
Glu Phe Val Gly Met Val Ser Ser Lys Gln Val Leu Gly Asp Pro Thr	
65 70 75 80	
ctc cgc acg cag cac ttc atc ggc ggc acg cgc tgg gag aag gtg tcc	288
Leu Arg Thr Gln His Phe Ile Gly Gly Thr Arg Trp Glu Lys Val Ser	
85 90 95	

gag gac gag gtc atc ggc tac cac cag ctg cgc gtc ccg cac cag agg 336

Glu Asp Glu Val Ile Gly Tyr His Gln Leu Arg Val Pro His Gln Arg

100

105

110

tac aag gac acc acc atg aag gag gtc acc atg aag ggc cac gcc cac 384

Tyr Lys Asp Thr Thr Met Lys Glu Val Thr Met Lys Gly His Ala His

115

120

125

tcg gca aac ctt cac tgg tac aag aag atc gac ggc gtc tgg aag ttc 432

Ser Ala Asn Leu His Trp Tyr Lys Lys Ile Asp Gly Val Trp Lys Phe

130

135

140

gcc ggc ctc aag ccc gat atc cgc tgg ggc gag ttc gac ttt gac agg 480

Ala Gly Leu Lys Pro Asp Ile Arg Trp Gly Glu Phe Asp Phe Asp Arg

145

150

155

160

atc ttt gag gac gga cgg gag acc ttt ggc gac aaa

516

Ile Phe Glu Asp Gly Arg Glu Thr Phe Gly Asp Lys

165

170

<210> 4

<211> 172

<212> PRT

<213> *Pyricularia oryzae*

<400> 4

Met Gly Ser Gln Val Gln Lys Ser Asp Glu Ile Thr Phe Ser Asp Tyr

1	5	10	15
Leu Gly Leu Met Thr Cys Val Tyr Glu Trp Ala Asp Ser Tyr Asp Ser			
20	25	30	
Lys Asp Trp Asp Arg Leu Arg Lys Val Ile Ala Pro Thr Leu Arg Ile			
35	40	45	
Asp Tyr Arg Ser Phe Leu Asp Lys Leu Trp Glu Ala Met Pro Ala Glu			
50	55	60	
Glu Phe Val Gly Met Val Ser Ser Lys Gln Val Leu Gly Asp Pro Thr			
65	70	75	80
Leu Arg Thr Gln His Phe Ile Gly Gly Thr Arg Trp Glu Lys Val Ser			
85	90	95	
Glu Asp Glu Val Ile Gly Tyr His Gln Leu Arg Val Pro His Gln Arg			
100	105	110	
Tyr Lys Asp Thr Thr Met Lys Glu Val Thr Met Lys Gly His Ala His			
115	120	125	
Ser Ala Asn Leu His Trp Tyr Lys Lys Ile Asp Gly Val Trp Lys Phe			
130	135	140	
Ala Gly Leu Lys Pro Asp Ile Arg Trp Gly Glu Phe Asp Phe Asp Arg			
145	150	155	160

Ile Phe Glu Asp Gly Arg Glu Thr Phe Gly Asp Lys

165

170

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

gcagtgatac ccacaccaa g

21

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

ttatttgatcg gcaaaggtct cc

22

<210> 7

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7

agttcgaact ggaattcaac cggcacgcat gatgcatgca ttta

44

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

atgggttcgc aagttcaaaa g

21

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9

gtggcccttc atggtgacct cct

23

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

acaagctctg ggaggcaatg

20

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

atcgtcgacg tgaattcgtc ttgtaaaagc cgccaac

37

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

ttcgtcggca tggctctcgag catctag

27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/01980

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/31, C12N15/60, C07K14/47, C12N1/15, C12N1/19,
C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/31, C12N15/60, C07K14/47, C12N1/15, C12N1/19,
C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA(STN), BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JSTPLUS FILE(JOIS)
SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOTOYAMA T. et al., cDNA cloning, expression, and mutagenesis of scytalone dehydratase needed for pathogenicity of the rice blast fungus, <i>Pyricularia oryzae.</i> , <i>Biosci.Biotechnol.Biochem.</i> 1998, Vol.62, No.3, pages 564 to 566	1-11
A	NAKASAKO M. et al., Cryogenic X-ray crystal structure analysis for the complex of scytalone dehydratase of a rice blast fungus and its tight-binding inhibitor, carpropamid: the structural basis of tight-binding inhibition., <i>Biochemistry</i> 1998, Vol.37, pages 9931 to 9939	1-11

☐

Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 April, 2003 (17.04.03)

Date of mailing of the international search report
30 April, 2003 (30.04.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/31, C12N15/60, C07K14/47, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/48

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/31, C12N15/60, C07K14/47, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPLUS ファイル (JOIS)

SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	MOTOYAMA T. et al. cDNA cloning, expression, and mutagenesis of scytalone dehydratase needed for pathogenicity of the rice blast fungus, <i>Pyricularia oryzae</i> ., Biosci. Biotechnol. Biochem. 1998, Vol. 62, No. 3, p. 564-566	1-11
A	NAKASAKO M. et al. Cryogenic X-ray crystal structure analysis for the complex of scytalone dehydratase of a rice blast fungus and its tight-binding inhibitor, carpropamid: the structural basis of tight-binding inhibition., Biochemistry 1998, Vol. 37, p. 9931-9939.	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.04.03

国際調査報告の発送日

30.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4 B

3037

電話番号 03-3581-1101 内線 3488